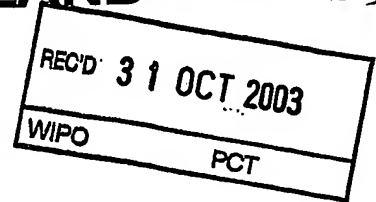


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 42 319.9

**Anmeldetag:** 12. September 2002

**Anmelder/Inhaber:** AVONTEC GmbH, Göttingen/DE

**Bezeichnung:** Funktionelle Korrektur der <sup>-786</sup>C/T-Varianz des  
humanen eNOS-Gens

**IPC:** C 12 N, A 61 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. Oktober 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Scholz

### Zusammenfassung

- Die vorliegende Erfindung betrifft Decoy-Oligonukleotide mit der Nukleinsäuresequenz gemäß
- 5 SEQ ID NO:1 bis 34 sowie deren Verwendung als Arzneimittel. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der  $^{-786}$ C/T-Varianz im *eNOS*-Gen.

Funktionelle Korrektur der <sup>-786</sup>C/T-Varianz des humanen *eNOS*-Gens

Die vorliegende Erfindung betrifft Decoy-Oligonukleotide mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 34 sowie deren Verwendung als Arzneimittel. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der <sup>-786</sup>C/T-Varianz im *eNOS*-Gen.

Ein wesentliches Ziel der Dechiffrierung des menschlichen Genoms ist es, krankmachende Gene, (aufgrund der Wirkungsweise ihrer Produkte) bzw. krankmachende Veränderungen in der Struktur dieser Gene (Polymorphismen) zu identifizieren und einem Krankheitsbild zuzuordnen. Damit rückt die Kausaltherapie einer Vielzahl von Erkrankungen in greifbare Nähe, wenn man akzeptiert, dass diese durch eine definierte Anzahl von zu stark, zu schwach oder fehlerhaft exprimierten Genprodukten verursacht sind. Während für bestimmte Erbkrankheiten (z.B. Mukoviszidose) der in der Regel singuläre Gendefekt (monogenetische Erkrankung) bereits bekannt ist, stellt sich die Situation für polygenetische Erkrankungen (z.B. Atherosklerose) wesentlich komplexer dar. So prädestiniert zwar das Zusammentreffen verschiedener Gendefekte die betroffenen Personen für die Erkrankung, diese entwickelt sich aber erst bei Exposition gegenüber bestimmten Umweltfaktoren. Ungeachtet dessen bietet der gezielte Eingriff in die Expression eines oder mehrerer Gene auch bei polygenetischen Erkrankungen die Chance einer ursachen- und nicht lediglich symptombezogenen Therapie.

Die Atherosklerose mit ihren primären Folgeerkrankungen Herzinfarkt, Herz- und Niereninsuffizienz sowie dem Schlaganfall ist in den Industrienationen für mehr als 50% aller Todesfälle verantwortlich, wobei diese Tendenz weiter zunimmt. Im Jahr 2020 werden Atherosklerose-bedingte Herz-Kreislaufkrankungen, nicht zuletzt aufgrund der steigenden Lebenserwartung, weltweit die häufigste Todesursache darstellen. Neben der vermuteten genetischen Prädisposition zählen Bluthochdruck, Hypercholesterolemie, Rauchen und Diabetes (Typ I und II) zu den primären Risikofaktoren der Atherosklerose. Diese können mit Ausnahme der Prädisposition und dem (Zigaretten)Rauchen medikamentös behandelt werden, wobei diese Behandlung in der Regel erst dann einsetzt, wenn die betroffenen Personen symptomatisch geworden sind, d.h. bereits manifeste atheromatöse Plaques in den Wänden der Arterien.

insbesondere der Herzkranzgefäße, der Karotiden und Cerebralgefäße sowie den Nierengefäßen aufweisen. Oft bleibt als Therapieoption zur Vermeidung eines zerebralen, myokardialen oder renalen Infarktes nur die Aufdehnung der blockierten Arterien mit Hilfe eines Ballonkatheters mit und ohne anschließende Platzierung einer Gefäßstütze (Stent) oder die Bypass-Operation, bei der die blockierte Arterie mit Hilfe eines autologen Arterien- oder Venensegments umgangen wird. Ein Problem dieser Eingriffe ist neben der hohen Wiederverschlussrate des behandelten Gefäßes (circa 30% für den Ballonkatheter/Stent nach 6-12 Monaten und circa 50% für den aortokoronaren Venenbypass nach 1-5 Jahren) die Tatsache, dass es sich bei der Atherosklerose um eine systemische Grunderkrankung handelt, die sich jederzeit in einem zuvor noch nicht betroffenen Gefäßabschnitt manifestieren kann.

Ein noch größeres medizinisches Problem stellen, weniger im Hinblick auf die Mortalität sondern vielmehr die hiermit assoziierte Morbidität und die unter Umständen lebenslange Therapie betreffend, chronische Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen dar. Darüber hinaus verursachen die bei diesem Patientenkreis in der Regel systemisch verabreichten, stark wirksamen Entzündungshemmer wie Glukokortikoide (z.B. Prednison), Immunsuppressiva (z.B. Cyclosporin A) und Antimetabolite (z.B. Azathioprin) zum Teil gravierende Nebenwirkungen. Hierzu zählen insbesondere Myelotoxizität, Neurotoxizität, Nephrotoxizität, Stoffwechselstörungen bis hin zur Induktion eines Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Infektionen und Malignome. Beispielsweise entwickeln 25% der Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit dem Zytostatikum Methotrexat behandelt werden, innerhalb von 2 Jahren eine schwere Leberzirrhose. Zu den zahlenmäßig bedeutendsten, chronischen Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen zählen die chronisch obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem (zusammengefasst als chronisch obstruktive Lungenerkrankungen oder COPD; Prävalenz in Deutschland 4-7%), die Schuppenflechte (Psoriasis; 2-3%), die rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthrit; 0,8%) und der Insulin-abhängige Diabetes mellitus (Typ I; 0,5%). Diesen Erkrankungen liegt, mutmaßlich auf dem Boden verschiedener genetischer Prädispositionen, eine Immunregulationsstörung im Sinne einer übermäßigen Aktivierung von T-Helferzellen des Typs 1 (Th1) zugrunde.

Auch in der Pathogenese der Atherosklerose spielt die Infiltration dieser Immunzellen in die Gefäßwand eine wichtige Rolle. Weitere Beispiele für eine Überaktivierung von Th1-Zellen sind

die Transplantatabstoßung, die Kontaktdermatitis sowie persistierende Folgeerkrankungen bakterieller oder viraler Infektionen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde Mittel für eine Prävention, Therapie oder Diagnostik der genannten Erkrankungen zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 zeigt die Sequenz des humanen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (*eNOS*)-Gens im Bereich der T→C Transition an Position -786. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Konsensusbindungsstellen für zwei bekannte Transkriptionsfaktoren.

Figur 2 zeigt die fehlende Stimulierbarkeit der *eNOS*-Expression auf (A) mRNA (n=8-12) und (B) Proteinebene (n=3) in kultivierten Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene von Spendern mit <sup>-786</sup>C/C-Genotyp isoliert worden waren, im Vergleich zu Endothelzellen von Spendern mit <sup>-786</sup>C/T und insbesondere <sup>-786</sup>T/T-Genotyp. Dargestellt ist die prozentuale Steigerung der Expression in Zellen, die für 24 Stunden (mRNA) bzw. 36 Stunden (Protein) in einem Kegel-Platte-Viskosimeter einer Wandschubspannung (WSS) von 30 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt worden waren, im Vergleich zu Zellen desselben Spenders, die für diesen Zeitraum unter statischen Bedingungen inkubiert wurden (\*P<0,05 im Vergleich zur statischen Kontrolle).

Figur 3 zeigt die Wiederherstellung der Schubspannungsinduktion der *eNOS*-Expression in kultivierten Endothelzellen von Spendern mit <sup>-786</sup>C/C-Genotyp, die für 4 Stunden mit einem C-Typ (SEQ ID NO: 1) nicht aber mit einem T-Typ-Allel Decoy-Oligonukleotid (SEQ ID NO: 3) vorbehandelt worden waren (Konzentration im Medium von 10 µmol/l). Dargestellt ist die prozentuale Steigerung der mRNA-Expression in Zellen, die für 24 Stunden in einem Kegel-Platte-Viskosimeter einer Wandschubspannung (WSS) von 30 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt worden waren, im Vergleich zu Zellen desselben Spenders, die für diesen Zeitraum unter statischen Bedingungen inkubiert wurden (n=4; \*P<0,05 im Vergleich zur statischen Kontrolle).

Figur 4 zeigt (A) die zeitabhängige Induktion der *eNOS*-Expression auf mRNA (statistische

Zusammenfassung,  $n=3-10$ ,  $*P<0,05$  vs. nicht stimulierte Zellen) und Proteinebene (repräsentative Western-Blot-Analyse) durch IL-10 (2 ng/ml) in kultivierten Endothelzellen von Spendern mit  $^{-786}T/T$ -Genotyp, die zuvor 9 Stunden mit Vitamin D3 (10 nmol/l) vorbehandelt worden waren, um die Expression des IL-10 Rezeptors zu stimulieren. In (B) ist die fehlende Induktion der eNOS-Expression durch IL-10 unter ansonsten identischen experimentellen Bedingungen in kultivierten Endothelzellen von Spendern mit  $^{-786}C/C$ -Genotyp gezeigt (statistische Zusammenfassung,  $n=6$ ,  $*P<0,05$  vs. nicht stimulierte Zellen).

Figur 5 zeigt die Auswirkungen der IL-10 (2 ng/ml) induzierten verstärkten eNOS-Expression auf die CD154-stimulierte ( $2 \times 10^5$  Maus-Myelomzellen/ml) *de novo* Synthese von IL-12 p40 auf (A) mRNA und (B) Proteinebene über 6 Stunden in IL-10 Rezeptor-exprimierenden kultivierten Endothelzellen von Spendern mit  $^{-786}T/T$  bzw.  $^{-786}C/T$ -Genotyp sowie deren Modulation mittels Blockade der eNOS-Aktivität durch Nitroarginin. Statistische Zusammenfassungen der RT-PCR-Analysen (mit rpl32 als internem Standard;  $n=6$ ) und ELISA-Daten ( $n=6-10$ ;  $*P<0,05$  vs. CD154-stimulierte Kontrollzellen).

Figur 6 zeigte die fehlende Hemmung der CD154-stimulierten IL-12 p40-Expression in IL-10 Rezeptor-exprimierenden kultivierten Endothelzellen von Spendern mit  $^{-786}C/C$ -Genotyp sowie deren Restaurierung durch Vorbehandlung der Zellen (4 Stunden, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) mit dem C-Typ-Allel Decoy-Oligonukleotid (SEQ ID NO: 5). Statistische Zusammenfassung der RT-PCR-Analysen (mit rpl32 als internem Standard;  $n=7-15$ ,  $*P<0,05$  vs. CD154-stimulierte Kontrollzellen).

Der hier verwendete Ausdruck "Decoy-Oligonukleotid" oder "Cis-Element Decoy" bezeichnet ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das eine Sequenz aufweist, die der natürlichen Kernbindungssequenz eines DNA-bindenden Proteins oder Proteinkomplexes im Genom entspricht oder ähnelt und an die das Protein oder der Proteinkomplex in der Zelle bindet. Das Cis-Element Decoy wirkt somit als Molekül zur kompetitiven Inhibierung (besser Neutralisierung) des Proteins oder Proteinkomplexes, das/der die Expression der eNOS, eines Gens mit einer nachgewiesenen wichtigen Schutzfunktion, bei Vorliegen des  $^{-786}C/C$ -Genotyps blockiert und somit prädisponierend für die Ausbildung der in den Patentansprüchen definierten Erkrankungen und Komplikationen wirkt (siehe unten).

Der hier verwendete Begriff "C/T-Varianz" bezeichnet das Vorliegen einer heterozygoten oder homozygoten T zu C Transition an Position -786 des humanen eNOS-Gens. Demzufolge ist der hier verwendete Begriff "C/C-Genotyp" die homozygote T zu C Transition und der C/T-Genotyp die heterozygote T zu C Transition.

Die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Endothelzellen der Gefäßwand spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Organdurchblutung und in der Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität. Die letztgenannte Wirkung von NO beruht insbesondere auf der Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Darüber hinaus inhibiert NO die Expression von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen im Endothel. Hierdurch wird bei entzündlichen Prozessen die Rekrutierung, Aktivierung und Transmigration von im Blut zirkulierenden Leukozyten unterdrückt. Insofern wird NO u. a. eine wichtige Rolle in der Prävention der Atherosklerose zugeschrieben, die nach heutigem Verständnis eine chronisch rezidivierende Entzündungserkrankung der Gefäßwand darstellt.

Die NO-Bildung in den Endothelzellen wird von der so genannten endothelialen NO-Synthase (eNOS) katalysiert, der physiologisch wichtigste Reiz für die Aktivität des Enzyms ist eine Veränderung der Wandschubspannung. Das ist die durch das strömende Blut auf die Endothelzellen, welche die Arterien und Venen innen auskleiden, ausgeübte visköse Zugspannung. So führt ein Anstieg der Wandschubspannung, ausgelöst durch eine Konstriktion des Blutgefäßes oder einen Anstieg des Blutflusses, zu einer Steigerung der NO-Synthaseaktivität und infolgedessen zu einer NO-vermittelten Vasodilatation, d.h. Zunahme der Organdurchblutung. Neben dieser akuten Änderung der Enzymaktivität führt ein Anstieg der Wandschubspannung mittelfristig auch zu einer verstärkten Expression der NO-Synthase in den Endothelzellen. Bedingt durch die ständigen lokalen Änderungen der Wandschubspannung ist die schubspannungsinduzierte Induktion (besser Aufrechterhaltung) der NO-Synthase-Expression von entscheidender Bedeutung für die NO-Synthesekapazität des Gefäßendothels und damit für die strukturelle und funktionelle Integrität der Gefäßwand (Gimbrone et al. (2000) Ann. N. Y. Acad. Sci. 920, 230).

Interleukin-10 (IL-10) ist ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin bei chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen wie z.B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis oder

Morbus Crohn, die durch eine übermäßige Aktivierung von T-Helferzellen des Typs 1 verursacht sind (Moore et al. (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683). Auch in der Pathogenese der Atherosklerose spielt die Infiltration und Aktivierung von Th1-Zellen in der Gefäßwand eine wichtige Rolle (Daugherty und Rateri (2002) *Circ. Res.* 90, 1039). IL-10 hemmt die Bildung von IL-12 in den mit den Th1-Zellen kommunizierenden antigenpräsentierenden Zellen. Hierzu zählen insbesondere dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen; aber auch Endothelzellen sind in der Lage die für die Antigenpräsentation benötigten MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und biologisch aktives IL-12 freizusetzen. IL-12 selbst ist der wichtigste Faktor für die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu Th1-Zellen und stimuliert deren Proliferation (klonale Expansion). Interessanterweise kann die Synthese von IL-12 in humanen Endothelzellen nur nach Kostimulation über das CD40-Rezeptor/CD40-Ligand-System induziert werden (Lienenlücke et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30, 2864). Hierbei exprimieren die Endothelzellen in der Regel den Rezeptor (CD40) und aktivierte Th1-Zellen den CD40-Ligand (auch als CD154 bezeichnet).

Das humane *eNOS*-Gen weist eine Reihe von Polymorphismen auf, bei denen eine einzelne Base ausgetauscht ist (SNP für *single nucleotide polymorphism*), so auch eine T→C Transition im Promoter des Gens an Position -786 (Figur 1). Linkage-Analysen belegen, dass dieser Basenaustausch nicht isoliert vorkommt, sondern stets mit einer A→G Transition an Position -922 und einer T→A Transition an Position -1486 assoziiert ist. Die funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen ist mit Ausnahme der T→C Transition an Position -786 (siehe unten) bisher nicht bekannt (Wattanapitayakul et al. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 361). Bemerkenswert ist, dass in Westeuropa ebenso wie in der kaukasischen Bevölkerung Nordamerikas 12-15% homozygote Träger der <sup>-786</sup>C-Variante sind, d.h. sie weisen den Genotyp <sup>-786</sup>C/C auf. Circa 48% sind heterozygot für diesen SNP, d.h. sie weisen den Genotyp <sup>-786</sup>C/T auf und circa 38% sind homozygote Träger der <sup>-786</sup>T-Variante, d.h. sie weisen den Genotyp <sup>-786</sup>T/T auf. Weiterhin interessant ist, dass diese Mutation bei anderen Säugetieren (Hund, Maus, Ratte und Rind) offenbar nicht vorkommt, da an der entsprechenden Position im *eNOS*-Promoter dieser Spezies eine Base fehlt.

Die Erfinder haben überraschenderweise gefunden, dass Träger des <sup>-786</sup>C/C-Genotyps – unabhängig von den anderen primären Risikofaktoren Bluthochdruck, Hypercholesterolemie,



Rauchen und Diabetes – von einer rascheren Progredienz der koronaren Herzkrankheit (KHK, manifeste Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen) betroffen sind (19,7% der KHK-positiven Patienten (n=122) weisen den  $^{-786}\text{C}/\text{C}$ -Genotyp auf, aber nur 2,7% der KHK-negativen Patienten (n=111); die Häufigkeit des  $^{-786}\text{C}/\text{C}$ -Genotyps in der Normalbevölkerung beträgt 11,7% (n=540).

5 Demzufolge haben diese Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko, frühzeitig einen unter Umständen tödlichen Herzinfarkt zu erleiden. Nach diesen Ergebnissen ist der Grund für die raschere Manifestierung der Atherosklerose bei den homozygoten Trägern des Gendefekts eine verminderte NO-Synthesekapazität der Endothelzellen.

10 So konnten die Erfinder nachweisen, dass in kultivierten Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene von Spendern mit dem  $^{-786}\text{C}/\text{C}$ -Genotyp isoliert worden waren, die typische durch eine Erhöhung der Wandschubspannung hervorgerufene Steigerung der eNOS-Expression auf mRNA- ebenso wie auf Proteinebene ausbleibt (Figur 2). Nach Vorbehandlung der Endothelzellen mit einem 22 bp langen Decoy-Oligonukleotid, welches dem C-Typ (SEQ ID  
15 NO: 1) nicht aber dem T-Typ-Allel (SEQ ID NO: 3) des *eNOS*-Gens entspricht, konnte dagegen eine deutliche Zunahme der eNOS-Expression durch Erhöhung der Wandschubspannung ausgelöst werden (Figur 3).

Die Transkription wird von Proteinen gesteuert, die sich an die Starterregion eines Gens  
20 (Promotorregion) binden. Die korrekte Zusammenlagerung mehrerer dieser Transkriptionsfaktoren (Transkriptosom) bewirkt eine Aktivierung der RNA-Polymerase und initiiert die Transkription. Andererseits kann die Bindung eines falschen Transkriptionsfaktors die Bildung des Transkriptosoms verhindern und damit die Expression des Gens blockieren. Decoy-Oligonukleotide imitieren das Sequenzmotiv, an welches sich der Ziel-Transkriptionsfaktor in  
25 der Starterregion seines (seiner) Zielgens (Zielgene) bindet, und neutralisieren diesen. Infolgedessen wird die durch diesen Transkriptionsfaktor vermittelte Induktion bzw. Repression der Transkription verhindert.

30 Ferner haben die Erfinder gefunden, dass humane Endothelzellen nach Exposition gegenüber verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen, d.h. unter (simulierten) Entzündungsbedingungen, ebenso wie nach Behandlung mit Vitamin D3, den Rezeptor für IL-10 exprimieren. Die Stimulation des Rezeptors, d.h. Inkubation der IL-10 Rezeptor exprimierenden Zellen mit IL-10, resultierte weiterhin in einer deutlichen Steigerung der eNOS-Expression in

den Endothelzellen (Figur 4); ein Effekt, der mit Hilfe von elektrophoretischen Mobilitätsshift-Analysen und dem Einsatz entsprechender Decoy-Oligonukleotide auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3 zurückgeführt werden konnte. Eine funktionelle Konsequenz dieser IL-10-vermittelten Steigerung der eNOS-Expression war die Hemmung der CD154-induzierten Neusynthese von IL-12 in den Endothelzellen (Figur 5), die NO-sensitiv ist (Modulation durch den NO-Synthase-Inhibitor Nitroarginin). Demnach kann IL-10 seine anti-inflammatorische Wirkung bei Th1-gewichteten chronischen Entzündungserkrankungen, insbesondere die Hemmung der IL-12-Synthese in den Endothelzellen, durch eine Steigerung der eNOS-Expression und der damit assoziierten verstärkten NO-Bildung entfalten.

Die für den IL-10-Effekt wichtige STAT-Bindungsstelle im Promoter des humanen *eNOS*-Gens liegt circa 60 Basenpaare oberhalb der T→C Transition an Position -786. Die Erfinder konnten zeigen, dass der <sup>-786</sup>C/T-Polymorphismus einen Effekt auf die Induzierbarkeit der eNOS-Expression durch IL-10 hat. So kam es in Endothelzellen von Spendern mit <sup>-786</sup>C/C-Genotyp – trotz Vitamin D3-Induktion der IL-10 Rezeptor-Expression – zu keiner Steigerung der eNOS-Expression durch IL-10 (Figur 4). Darüber hinaus hemmte die IL-10-Exposition die CD154-induzierte Synthese von IL-12 in diesen Zellen nicht, sondern verstärkte diese sogar (Figur 6). Bedingt durch die räumliche Nähe kommt es zu einer Hemmung der Bildung des Transkriptosoms im Bereich der STAT-Bindungsstelle durch den an Position -786 bindenden inhibitorischen Transkriptionsfaktor. Experimentelle Daten belegen, dass dieses Defizit, d.h. die fehlende Induktion der eNOS-Expression durch IL-10 und infolgedessen die fehlende IL-10-vermittelte Hemmung der IL-12-Synthese, durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem zuvor beschriebenen C-Typ-Allel Decoy-Oligonukleotid (SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 5) vollständig kompensiert werden kann (Figur 6).

Eine weitere vergleichende Genotypisierung zeigt beispielsweise, dass kaukasische Patienten mit rheumatoider Arthritis eine in der Tendenz deutlich höhere Prävalenz des <sup>-786</sup>C/C-Genotyps aufweisen als in der Normalbevölkerung (17,2% (n=227) im Vergleich zu 11,7% (n=540)). Bei diesen Patienten kann die intraartikuläre Applikation eines Decoy-Oligonukleotids während des Entzündungsschubs die endogene IL-10-vermittelte Hemmung der Th1-Zellantwort nachhaltig verstärken bzw. erst ermöglichen und so den Entzündungsprozess und die damit assoziierte Knorpeldestruktion im betroffenen Gelenk abschwächen. Weitere Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich bei den in den Patentansprüchen definierten Erkrankungen bzw. Komplikationen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Bereitstellung eines doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids, das in der Lage ist, sequenzspezifisch an ein Protein oder einen Proteinkomplex (im nachfolgenden als "Transkriptionsfaktor" oder "inhibitorischer Transkriptionsfaktor" bezeichnet) zu binden. Die Sequenz des doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids, das zur Verhinderung der Bindung des inhibitorischen Transkriptionsfaktors verwendet wird, ist die Sequenz, an die der Transkriptionsfaktor im Promoter des *eNOS*-Gens bindet. Das erfindungsgemäße Cis-Element Decoy weist folgende 10-mer Konsensus-Kernbindungssequenz auf: 5'-CTBBCYGBCT-3' (SEQ ID NO: 33) wobei Y=C oder T und B=C, G oder T bedeutet.

Das Cis-Element Decoy kann ferner größer als die 10-mer Kernbindungssequenz sein und am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende verlängert werden. Entsprechende Mutationen im Bereich der Kernbindungssequenz (z.B. 5'-CTAGCTGACT-3') führen zu einem kompletten Verlust der Bindung des Transkriptionsfaktors an das Decoy-Oligonukleotid, sichtbar an der fehlenden biologischen Wirkung (Tabelle 1).

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Bereitstellung doppelsträngiger DNA-Oligonukleotide, die in der Lage sind, sequenzspezifisch an den Transkriptionsfaktor zu binden und eine der folgenden Sequenzen haben, wobei hier nur jeweils ein Strang der doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide wiedergegeben ist und der komplementäre Strang ebenfalls umfasst ist:

5'-AGCTCTTCCCTGGCCGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 1),

5'-AGCTCTTCCCTGGCTGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 3),

5'-CTTCCCTGGCCGGCTGACCCTGC-3' (SEQ ID NO: 5),

5'-CTTCCCTGGCTGGCTGACCCTGC-3' (SEQ ID NO: 7),

5'-GCTCTTCCCTGGCCGGCTG-3' (SEQ ID NO: 9),

5'-CAAGCTCTTCCCTGGCCGG-3' (SEQ ID NO: 11),

5'-TCTTCCCTGGCCGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 13),

5'-CTGGCCGGCTGACCCTGCC-3' (SEQ ID NO: 15),

5'-TCCCTGGCCGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 17),

5'-CTGGCCGGCT-3' (SEQ ID NO: 19),

5'-CTGGCTGGCT-3' (SEQ ID NO: 21),

5'-TCCCTGGCYGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 23), wobei Y=C oder T bedeutet,

5'-CTGGCYGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 25), wobei Y=C oder T bedeutet,

5'-TCCCTBBCYGBCTGAC-3' (SEQ ID NO: 27) mit Y=C oder T und B=C, G oder T,  
 5'-CCCTBBCYGBCTG-3' (SEQ ID NO: 29) mit Y=C oder T und B=C, G oder T,  
 5'-CTBBCYGBCTGAC-3' (SEQ ID NO: 31) mit Y=C oder T und B=C, G oder T, und  
 5'-CTBBCYGBCT-3' (SEQ ID NO: 33) mit Y=C oder T und B=C, G oder T.

5

Insofern stellt die Verwendung der erfindungsgemäßen doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide, auch Decoy-Oligonukleotid oder Cis-Element Decoy genannt, die eine Konsensus-Kernbindungsstelle für den inhibitorischen Transkriptionsfaktor enthalten, das bevorzugte Verfahren zur spezifischen Inhibierung der Aktivität dieses Faktors dar. Die exogene Zufuhr einer großen Zahl von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu einer Zelle, insbesondere in viel höherer Zahl als im Genom vorhanden, erzeugt eine Situation, in der die Mehrzahl eines bestimmten Transkriptionsfaktors spezifisch an das jeweilige Cis-Element Decoy und nicht an seine endogenen Ziel-Bindungsstellen bindet. Dieser Ansatz zur Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre endogene Bindungsstelle wird auch als Squenching bezeichnet. Squenching (oder auch Neutralisation genannt) von Transkriptionsfaktoren unter Verwendung von Cis-Element Decoys wurde u. a. erfolgreich bei Patienten eingesetzt, um ein übermäßiges Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen in aortokoronaren Venenbypassen zu inhibieren. Dabei wurden DNA-Fragmente verwendet, die spezifische Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F enthalten (Mann et al (1999) Lancet 354, 1493).

20

Abgesehen von der grundsätzlichen Voraussetzung, dass die erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide den inhibitorischen Transkriptionsfaktor *in vitro* effektiv neutralisieren, ist es für die therapeutische Wirksamkeit entscheidend, dass das DNA-Molekül schnell und in einem ausreichenden Umfang in die Zielzelle aufgenommen wird. Darüber hinaus sollte das erfindungsgemäße Cis-Element Decoy eine bestimmte Länge nicht überschreiten, da dies für den Transport in die Zielzelle limitierend ist. Geeignet ist jedes Decoy-Oligonukleotid mit einer Länge von mindestens 10 bp (Konsensus-Kernbindungssequenz) bis zu einer Länge von etwa 30 bp, vorzugsweise bis zu einer Länge von etwa 27 Basenpaaren, besonders bevorzugt bis zu einer Länge von etwa 23, insbesondere bevorzugt jede Länge von 10 bis 23 Basenpaaren.

30

Da das Cis-Element Decoy eine doppelsträngige Nukleinsäure ist, umfasst das erfindungsgemäße DNA-Oligonukleotid jeweils nicht nur die Sense- oder Forward-Sequenz sondern auch die komplementäre Antisense- oder Reverse-Sequenz. Bevorzugte erfindungsgemäße DNA-

Oligonukleotide weisen eine 10-mer-Kernbindungssequenz für den inhibitorischen Transkriptionsfaktor auf, wie sie in SEQ ID NO:33 enthalten ist. Das Cis-Element Decoy kann jedoch auch eine zur vorstehenden Sequenz abweichende Sequenz aufweisen und länger als ein 10-mer sein. Besonders bevorzugt sind die Sequenzen wie sie in SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:34 enthalten sind. Diese Aufzählung der bevorzugten Sequenzen ist nicht abschließend. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass eine Vielzahl von Sequenzen als Inhibitor für den Transkriptionsfaktor verwendet werden können, solange sie die vorstehend aufgeführten Bedingungen der 10-mer Konsensus-Kernbindungssequenz und eine Affinität zu dem Transkriptionsfaktor aufweisen.

10

Die Affinität der Bindung einer Nukleinsäuresequenz an diesen Transkriptionsfaktor kann durch die Verwendung des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) bestimmt werden. Dieses Testsystem ist für die Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren, die für die Verwendung in der Methode der gegenwärtigen Erfindung gedacht sind, oder die Bestimmungen der optimalen Länge einer Bindungsstelle geeignet. Sie ist auch für die Identifizierung von anderen Sequenzen, die durch den Transkriptionsfaktor gebunden werden, geeignet.

15

Die Methode der vorliegenden Erfindung moduliert die Transkription eines Gens oder von Genen in einer solchen Weise, dass das Gen oder die Gene, z.B. *eNOS*, vermehrt exprimiert werden. Vermehrte Expression im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung bedeutet, dass die Transkriptionsrate gesteigert ist im Vergleich zu Zellen, die nicht mit einem erfindungsgemäßen doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid behandelt werden. Solch eine Steigerung kann beispielsweise durch Northern Blot (Sambrook et al., 1989) oder RT-PCR (Sambrook et al., 1989) bestimmt werden. Typischerweise ist eine solche Steigerung zumindest eine 2-fache, besonders zumindest eine 5-fache, insbesondere zumindest eine 10-fache Enthemmung der Genexpression.

25

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- und Exonukleasen, im besonderen DNasen und RNasen in der Zelle abgebaut. Deshalb können die Nukleinsäuren modifiziert werden, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so dass über einen längeren Zeitraum eine hohe Konzentration der Oligonukleotide in der Zelle beibehalten wird. Typischerweise kann eine

30

solche Stabilisierung durch die Einführung einer oder mehrerer modifizierter Internukleotidbindungen erhalten werden.

Ein erfolgreich stabilisiertes DNA-Oligonukleotid enthält nicht notwendigerweise eine Modifikation an jeder Internukleotidbindung. Vorzugsweise sind die Internukleotidbindungen an den jeweiligen Enden beider Oligonukleotide des Cis-Element Decoys modifiziert. Dabei können die letzten sechs, fünf, vier, drei, zwei oder die letzte oder eine oder mehrere Internukleotidbindungen innerhalb der letzten sechs Internukleotidbindungen modifiziert sein. Ferner können verschiedene Modifikationen der Internukleotidbindungen in die Nukleinsäure eingeführt werden und die daraus entstehenden doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide auf sequenzspezifische Bindung an den inhibitorischen Transkriptionsfaktor, unter Verwendung des Routine EMSA-Testsystems, getestet werden. Dieses Testsystem erlaubt die Bestimmung der Bindungskonstante des Cis-Element Decoys und so die Bestimmung, ob die Affinität durch die Modifikation verändert wurde. Modifizierte Cis-Element Decoys, die noch eine ausreichende Bindung zeigen, können ausgewählt werden, wobei eine ausreichende Bindung zumindest etwa 50% oder zumindest etwa 75%, und besonders bevorzugt etwa 100% der Bindung der unmodifizierten Nukleinsäure bedeutet.

Cis-Element Decoys mit modifizierter Internukleotidbindung, die immer noch ausreichende Bindung zeigen, können überprüft werden, ob sie stabiler in der Zelle sind als unmodifizierte Cis-Element Decoys. Die mit den erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys "transfizierten" Zellen werden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Menge der dann noch vorhandenen Cis-Element Decoys untersucht. Dabei wird vorzugsweise ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Texas-Rot) markiertes Cis-Element Decoy oder ein radioaktiv markiertes (z.B.  $^{35}\text{S}$ ) Cis-Element Decoy eingesetzt mit anschließender digitaler Fluoreszenzmikroskopie bzw. Autoradiographie oder Szintigraphie. Ein erfolgreich modifiziertes Cis-Element Decoy hat eine Halbwertszeit in der Zelle, die höher ist als die eines unmodifizierten Cis-Element Decoys, vorzugsweise von zumindest etwa 48 Stunden, mehr bevorzugt von zumindest etwa 4 Tagen, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 7 Tagen.

Geeignete modifizierte Internukleotidbindungen sind in Uhlmann und Peyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544) zusammengefasst. Modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken in einer Nukleinsäure, die in einer Methode der gegenwärtigen Erfindung

eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Phosphoramidat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxan-Brücken, Carbonat-Brücken, Carboxymethylester-Brücken, Acetamidat-Brücken und/oder Thioether-Brücken enthalten. Bei der Verwendung  
 5 Phosphorothioat-modifizierter Internukleotidbindungen sollten diese vorzugsweise nicht zwischen den Basen Cytosin und Guanin liegen, da dies zu einer Aktivierung der Zielzellen des Cis-Element Decoys im Sinne einer entzündlichen Reaktion führen kann.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Stabilisierung von Nukleinsäuren durch die  
 10 Einführung struktureller Merkmale in die Nukleinsäure, welche die Halbwertszeit der Nukleinsäure erhöhen. Solche Strukturen, die Haarnadel- und Glocken-DNA enthalten, sind in US 5,683,985 offenbart. Gleichzeitig können modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken, zusammen mit den genannten Strukturen, eingeführt werden. Die sich  
 15 daraus ergebenden Nukleinsäuren können im oben beschriebenen Testsystem auf Bindung und Stabilität geprüft werden.

Ein Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung wird schnell in die Zelle aufgenommen. Eine ausreichende Aufnahme ist durch die Modulation der Expression von einem oder mehreren Genen, die einer Kontrolle durch den Ziel-Transkriptionsfaktor unterliegen, charakterisiert (z.B.  
 20 *eNOS*). Das Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung moduliert in bevorzugter Weise die Transkription von einem Gen oder Genen nach etwa 4 Stunden der Berührung mit der Zelle, mehr bevorzugt nach etwa 2 Stunden, nach etwa 1 Stunde, nach etwa 30 Minuten und am meisten bevorzugt nach etwa 10 Minuten. Eine typische Mischung, die in so einem Versuch eingesetzt wird, enthält 10 µmol/l Cis-Element Decoy.

25.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere zur Prävention oder Therapie der Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen (insbesondere koronare Herzkrankheit, Angina pectoris, Herzinfarkt, auch infolge eines Koronarspasmus, Herzinsuffizienz, Schlaganfall und  
 30 periphere Verschlusskrankheit), chronischen Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritis), Schuppenflechte einschließlich Psoriasis-Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (insbesondere Morbus Crohn), Diabetes Typ I und II und deren Folgeerkrankungen (z.B. diabetische Nephropathie), der multiplen

Sklerose, von Sarkoidosen, Kollagenosen und Vaskulitiden (einschließlich Glomerulonephritiden), der akuten und chronischen Abstoßung (Vaskulopathie) transplanterter Organe, der *graft versus host disease* (GVHD) sowie dem Ischämie/Reperfusionsschaden von Organen im Anschluss an einen chirurgischen Eingriff, dem allergischen Kontaktekzem, der (Prä-)Eklampsie bzw. schwangerschaftsinduzierten Hypertonie, der arteriellen Hypertonie und ihren Folgeerkrankungen (insbesondere Linksherzhypertrophie und Gefäßwandumbau), der pulmonalen Hypertonie, der chronischen Niereninsuffizienz, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), bakteriellen Infektionen und ihren Folgeerkrankungen wie *Helicobacter pylori*-Gastritis, tuberkulöse Perikarditis, Lyme-Borreliose mit nachfolgender Borrelien-Arthritis bzw. Neuroborreliose, sowie Infektionen mit Hepatitis C- bzw. HI (*human immunodeficiency*)-Viren und deren Folgeerkrankungen (z.B. portale Hypertonie und Fibrose bzw. opportunistische Infektionen, insbesondere *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie).

Um die Wirksamkeit der therapeutischen Decoy-Oligonukleotide sicher zu stellen, sollten die Patienten auf die  $-786\text{C/T}$ -Varianz, d.h. auf die heterozygote oder homozygote Trägerschaft der  $-786\text{C}$ -Variante des *eNOS*-Gens, untersucht worden sein, vorzugsweise mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) oder Echtzeit-PCR/Schmelzkurven-Analyse.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Diagnose einer  $-786\text{C/T}$ -Varianz im humanen *eNOS*-Gen, umfassend die Schritte: Zugabe von DNA-Oligonukleotiden, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der  $-786$ -Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Sense-Strang entspricht und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der  $-786$ -Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Antisense-Strang entspricht, Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Durchführen einer DNA-Spaltung mit einem Restriktionsenzym, das eine Erkennungssequenz aufweist, die mindestens 4 Nukleotide lang ist und die Sequenz  $5'\text{-CCGG-}3'$  aber nicht die Sequenz  $5'\text{-CTGG-}3'$  enthält, und Nachweisen der durch die DNA-Spaltung erhaltenen DNA-Fragmente. Die DNA-Oligonukleotide dienen als Primer für die PCR.

Mit der *eNOS*-Sequenz ist die unter der GenBank Accession Number L10693 (gi:348219) aufgeführte Sequenz gemeint, die hier auch als Sense-Strang bezeichnet wird und dem Strang entspricht, der die mRNA-Sequenz des *eNOS*-Genproduktes enthält. Der Start wird mit +1



bezeichnet, entsprechend liegt die Position -786 vor dem Startpunkt stromaufwärts. Als Antisense-Strang wird der zum Sense-Strang komplementäre Strang bezeichnet, der auch als Matrize bezeichnet wird.

Die DNA-Oligonukleotide (Primer) können jede Länge aufweisen, die für eine PCR erforderlich ist. Die DNA-Oligonukleotide können ferner solche Sequenzen aus dem *eNOS*-Gens oder dem 5'-Bereich des *eNOS*-Gens aufweisen, dass eine PCR durchgeführt werden kann. Dazu müssen die Primer weit genug auseinander liegen, dass ein Nachweis der Amplifikate und der gespaltenen Amplifikate möglich ist, aber nicht soweit, dass kein Amplifikat mehr erzeugt wird.

Ferner sollten die Primer so ausgewählt werden, dass bei einer DNA-Spaltung DNA-Fragmente mit einer derart unterschiedlichen Größe entstehen, die einfach nachzuweisen sind. Vorzugsweise haben die Primer die Sequenzen gemäß SEQ ID NO:35 und 36. Vorzugsweise ist das Restriktionsenzym *HpaII* und das Nachweisverfahren eine Agarose-Gelelektrophorese oder eine Kapillarelektrophorese.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend die vorstehenden DNA-Oligonukleotide (Primer), Reagenzien zur Durchführung einer PCR vorzugsweise einschließlich der Taq-Polymerase, ein Restriktionsenzym und Reagenzien zur Durchführung einer DNA-Spaltung.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur schnellen Bestimmung des  $^{786}\text{C}/\text{T}$ -Varianz des humanen *eNOS*-Gens, umfassend folgende Schritte: Zugabe von DNA-Oligonukleotiden zu einer Patienten-DNA-Probe, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der -786-Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Sense-Strang entspricht (Primer 1), ein weiteres Fluoreszenzfarbstoff-modifiziertes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die die -786-Position des *eNOS*-Gens umfasst und dem Antisense-Strang entspricht und zur  $^{786}\text{C}$ -Variante des *eNOS*-Genpromotors komplementär ist (Detektionsprobe), ein weiteres Fluoreszenzfarbstoff-modifiziertes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die dem Antisense-Strang entspricht und wobei das 5'-Ende des DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 3'-Ende der Detektionsprobe liegt (Ankerprobe), und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der -786-Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Antisense-Strang entspricht (Primer 2), Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Nachweis der  $^{786}\text{C}$ - und/oder  $^{786}\text{T}$ -Variante mittels einer

# Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-gestützten DNA-Schmelzkurven-Analyse.

Die Primer 1 und 2 können jede Länge aufweisen, die für eine PCR erforderlich ist. Die Primer können ferner solche Sequenzen aus dem *eNOS*-Gens oder dem 5'-Bereich des *eNOS*-Gens aufweisen, dass eine PCR durchgeführt werden kann. Dazu müssen die Primer weit genug  
 5 auseinander liegen, dass ein Nachweis der Amplifikate und der gespaltenen Amplifikate möglich ist, aber nicht soweit, dass kein Amplifikat mehr erzeugt wird. Die Detektionsprobe ist am 3'-Ende kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Ankerprobe ist am 5'-Ende kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der sich von dem der Detektionsprobe unterscheidet. Ferner ist die Ankerprobe an 3'-Position der letzten Desoxyribose phosphoryliert  
 10 und weist eine Schmelztemperatur von 5-10°C über dem Schmelzpunkt der Detektionsprobe auf. Die Farbstoffkombination ist so gewählt, dass der excitierte Farbstoff der Detektionsprobe geeignet ist, den Farbstoff der Ankerprobe effizient durch FRET anzuregen, und Licht einer definierten Wellenlänge zu emittieren solange beide Proben in unmittelbare Nähe zueinander  
 15 sind. Vorzugsweise werden als Fluoreszenzfarbstoff der Detektionsprobe Fluorescein (Anregungswellenlänge 493 nm) und als Fluoreszenzfarbstoff der Ankerprobe LC Red-640 (Emission 640 nm) verwendet. Sowohl die Detektionsprobe als auch die Ankerprobe sind nicht für die PCR geeignet, da beide durch ihre chemischen Modifikationen in der 3'-Position keine enzymatische Kettenverlängerung erlauben. Vorzugsweise hat die Detektionsprobe eine Sequenz  
 20 gemäß SEQ ID NO:37 und die Ankerprobe eine Sequenz gemäß SEQ ID NO:38. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass andere DNA-Oligonukleotide als Detektions- bzw Ankerproben verwendet werden können, z.B. solche, die den Antisense-Strang binden.

Für die Bestimmung des Genotyps einer Patientenprobe werden in einen PCR-Ansatz neben den  
 25 für die PCR notwendigen Reagenzien und die zu untersuchende Patienten-DNA außerdem die Primer 1 und 2 und die Detektions- und Ankerprobe gegeben. Nach der durch die Primer 1 und 2 vermittelten PCR-Amplifikation eines Fragmentes des *eNOS* Promoters, welches die Position -786 des Gens enthält, wird die Temperatur des Ansatzes so erhöht, dass alle DNA-Doppelstränge denaturieren. Hierauf wird die Temperatur wieder erniedrigt, so dass Detektions-  
 30 und Ankerproben mit den Sense-Strängen des amplifizierten Fragmentes hybridisieren. Die Schmelzkurve wird nun durch Anregung des Farbstoffes der Detektionsprobe und kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz der Ankerprobe bei gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur (z.B. etwa 0,2°C pro Sekunde) aufgenommen. Hierbei wird ausgenutzt, dass die

Übertragung von Anregungsenergie des Farbstoffes der Detektionsprobe auf den der Ankerprobe nur so lange funktioniert, wie beide Proben an den Sense-Strang gebunden haben. Eine Unterscheidung der  $^{-786}\text{T}$ - von der  $^{-786}\text{C}$ -Variante erfolgt über die Temperatur, bei der die Detektionsprobe vom Sense-Strang abschmilzt, also die FRET-induzierte Fluoreszenz deutlich  
5 abnimmt. Dies ist für die Detektionsprobe bei Fragmenten mit der  $^{-786}\text{T}$ -Variante aufgrund des auftretenden G-T-Mismatches 5-10°C früher der Fall als bei Sense-Strängen mit der  $^{-786}\text{C}$ -Variante. Für den Nachweis wird vorzugsweise ein Fluoreszenz-basierendes Echtzeit-PCR-Gerät (z.B. der Light Cycler der Firma Roche) verwendet. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass nicht nur die Bestimmung eines Genotyps in einer PCR, sondern auch gleichzeitig die Bestimmung  
10 von mehr als einem Genotyp in einer PCR, in einer sogenannten Multiplex-PCR, durchgeführt werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner DNA-Oligonukleotide mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO:35 bis 38.

15

Das DNA-Oligonukleotid SEQ ID NO: 37 weist folgende Sequenz auf: 5'-GGGTCAGCCGGCCAGGGAA-3', wobei an das 3'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff, vorzugsweise Fluorescein, gekoppelt ist. Das DNA-Oligonukleotid SEQ ID NO: 38 weist folgende Sequenz auf: 5'-AGCTTGATGCCCTGGTGGGAG-3', wobei an das 5'-Ende ein  
20 Fluoreszenzfarbstoff, der verschieden ist von dem Fluoreszenzfarbstoff des DNA-Oligonukleotids gemäß SEQ ID NO:37, vorzugsweise LC Red 640, gekoppelt ist, und an das 3'-Ende ein Phosphatrest, vorzugsweise  $\text{PO}_4$ , gekoppelt ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend die vorstehenden Primer 1 und 2, zwei weitere DNA-Oligonukleotide (Detektionsprobe und Ankerprobe), Reagenzien zur Durchführung einer PCR vorzugsweise einschließlich der Taq-Polymerase, und Reagenzien zur Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse.  
25

30 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Modulation der Transkription von mindestens einem Gen in Zellen, insbesondere in eNOS-exprimierenden Zellen wie Endothelzellen, Epithelzellen der Lungen, Nieren und des weiblichen Urogenitaltraktes, Herzmuskelzellen, Thrombozyten und neuronale Zellen (Hippocampus), wobei die Methode den Schritt der

Kontaktierung der genannten Zellen mit einer Mischung, enthaltend eine oder mehrere erfindungsgemäße doppelsträngige Nukleinsäure(n), die in der Lage sind, sequenzspezifisch an den inhibitorischen Transkriptionsfaktor zu binden, umfasst. Ein bevorzugtes Verfahren ist z.B. die intraartikuläre Injektion der Nukleinsäurehaltigen Mischung in ein oder mehrere Gelenke bei Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Die Mischung enthaltend die erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys wird mit den Zielzellen (z.B. Endothelzellen) in Berührung gebracht. Das Ziel dieses In-Berührung-Bringens ist die Übertragung der Cis-Element Decoys, die den inhibitorischen Transkriptionsfaktor binden, in die Zielzelle (d.h. zum Beispiel die eNOS-exprimierende Endothelzelle). Deshalb können Nukleinsäure-Modifikation und/oder Zusatzstoffe oder Hilfsstoffe, von denen bekannt ist, dass sie die Durchdringung von Membranen erhöhen, im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung benutzt werden (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544).

Eine mit den Zielzellen in Berührung gebrachte Mischung gemäß der Erfindung enthält in einer bevorzugten Ausführungsform im Wesentlichen nur Nukleinsäure und Puffer. Der für Decoy-Oligonukleotide geeignete Konzentrationsbereich liegt bei 0,1 bis 100  $\mu\text{mol/l}$ , vorzugsweise bei 0,5 bis 25  $\mu\text{mol/l}$  und besonders bevorzugt bei 10  $\mu\text{mol/l}$ . Es können ein oder mehrere geeignete Puffer zugesetzt werden. Ein Beispiel eines solchen Puffers ist eine modifizierte Ringer-Lösung enthaltend 145 mmol/l  $\text{Na}^+$ , 5 mmol/l  $\text{K}^+$ , 11 mmol/l  $\text{Cl}^-$ , 2 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mmol/l  $\text{Mg}^{2+}$ , 10 mmol/l Hepes, 145 mmol/l Isethionat, 10 mmol/l D-Glucose, pH 6,5.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält die Mischung zusätzlich mindestens einen Zusatzstoff und/oder Hilfsstoff. Zusatzstoffe und/oder Hilfsstoffe wie Lipide, kationische Lipide, Polymere, Liposomen, Nanopartikel, Nukleinsäure-Aptamere, Peptide und Proteine, die an DNA gebunden sind, oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind beabsichtigt, um beispielsweise die Einbringung von Nukleinsäuren in die Zelle zu erhöhen, um die Mischung auf nur eine Untergruppe von Zellen zu richten, um den Abbau der Nukleinsäure in der Zelle zu verhindern, und um die Lagerung der Nukleinsäuremischung vor der Verwendung zu erleichtern. Beispiele für Peptide und Proteine oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind z.B. Antikörper, Antikörperfragmente, Liganden, Adhäsionsmoleküle, die alle modifiziert oder unmodifiziert sein können.

Zusatzstoffe, die die Cis-Element Decoys in der Zelle stabilisieren, sind beispielsweise Nukleinsäure-kondensierende Substanzen wie kationische Polymere, Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin.

- 5 Die Mischung, die in dem Verfahren der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt wird, wird bevorzugt lokal angewendet durch Injektion, Infusion, Katheter, pluronische Gele, Polymere, die anhaltend Medikamente freisetzen, oder jede andere Vorrichtung, die lokalen Zugang ermöglicht. Auch die *ex vivo* Anwendung der Mischung (Infusion bzw. Inkubation), verwendet im Verfahren der gegenwärtigen Erfindung, erlaubt einen lokalen Zugang.

10

Die folgenden Beispiele dienen nur der Erläuterung und beschränken in keiner Weise den Umfang der Erfindung.

### 1. Patienten

- 15 Für die Analyse der Häufigkeitsverteilung der  $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des *eNOS*-Gens bei koronarer Herzkrankheit (KHK) und rheumatoider Arthritis wurde aus Blut von Patienten (ca. 2 ml) genomische DNA isoliert und diese mittels einer PCR-Amplifikation mit folgender RFLP-Analyse (s. u.) auf die Varianz hin untersucht.

- Bei der Analyse von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte auf zwei bereits vorhandene  
20 Kollektive zurückgegriffen werden. Hierbei konnten anonymisierte (Zahlencode) DNA-Proben von Patientinnen und Patienten der Rheuma-Ambulanz der Universität Göttingen und der Abteilung Rheumatologie des Universitätsklinikums Freiburg auf die Varianz getestet werden. Beide Kollektive bieten eine typische Verteilung von Patientinnen und Patienten mit rheumatoider Arthritis, d.h. die betroffenen Personen sind zu etwa 80% weiblich. Das  
25 Altersprofil reichte von 20 Jahren bis zu 80 Jahren mit Häufungen (*peaks*) der Patientenzahlen bei 35-40 Jahren (*early onset*) und 60-70 Jahren (*late onset*).

- Für die Analyse der  $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des *eNOS*-Gens bei koronarer Herzkrankheit wurden Blutproben während der Durchführung einer Herzkatheteruntersuchung entnommen. Auf diese Weise konnte das Vorliegen der Erkrankung eindeutig festgestellt bzw. ausgeschlossen werden.  
30 Alle Patienten wurden vor der Blutabnahme mündlich und schriftlich aufgeklärt und hatten der Verwendung ihrer Blutproben schriftlich zugestimmt. Die Genotypisierung erfolgte in

anonymisierter Form (Zahlenkodierung), Alter, Diagnose, Geschlecht und Risikofaktorprofil der zugehörigen Personen wurden nach erfolgter Analyse mitgeteilt. Für die statistische Analyse der Genotypverteilung wurden Individuen bis 64 Jahre herangezogen. Die Verteilung der bereits bekannten primären Risikofaktoren für KHK (Hypertonie; Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen und Hypercholesterinämie) war unabhängig vom Genotyp der jeweiligen Patienten.

Als Vergleichskollektiv zur Genotypverteilung wurde DNA aus der Nabelschnurarterie von Neugeborenen aus Göttingen und Umgebung (im Umkreis von circa 70 km) verwendet. Auch diese Proben waren anonymisiert und die Eltern der Kinder hatten zuvor eine schriftliche Einverständniserklärung für die entsprechende Verwendung der Nabelschnur abgegeben.

## 2. Genotypisierung

Die <sup>-786</sup>C-Variante des humanen *eNOS*-Genpromotors besitzt im Vergleich zur <sup>-786</sup>T-Variante eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *Hpa* II und ist somit einer klassischen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) zugänglich.

Für die RFLP-Analyse wurden aus genomischer DNA (aus Blut mit Hilfe des QIAamp DNA Mini-Kits von Qiagen, Hilden, gewonnen) mit Hilfe *eNOS*-Promotor-spezifischer Primer (Vorwärtsprimer 5'-GAGTCTGGCCAACACAAATCC-3' (SEQ ID NO: 35); umgekehrter Primer 5'-GACCTCTAGGGTCATGCAGGT-3') (SEQ ID NO: 36) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein DNA-Fragment (657 Basenpaaren (bp); von Position -1135 bis -456 des humanen *eNOS*-Gens) amplifiziert und anschließend einer spezifischen Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease *Hpa* II unterworfen. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Je nach Genotyp entstehen aus dem 657 bp-Fragment 2 oder 3 kleinere DNA-Fragmente. Während die T-Variante des Promoters im betrachteten Abschnitt nur eine *Hpa* II-Schnittstelle besitzt und so nach Hydrolyse durch *Hpa* II in zwei Fragmente (284 bp und 373 bp) zerfällt, bewirkt die zusätzliche Schnittstelle der C-Variante, dass 3 Fragmente entstehen (46 bp – im verwendeten Elektrophoresesystem nicht detektierbar – 284 bp und 327 bp). Insofern ließen sich die drei möglichen Genotypen (<sup>-786</sup>C/C; <sup>-786</sup>T/T und <sup>-786</sup>C/T) nach Elektrophorese durch folgende Fragmentmuster eindeutig identifizieren: <sup>-786</sup>T/T: 284 und 373 bp; <sup>-786</sup>C/C: 284 und 327 bp; und <sup>-786</sup>C/T: 284, 327 und 373 bp.

### 3. Zellkultur

Humane Endothelzellen wurden durch Behandlung mit 1,6 U/ml Dispase in HEPES-modifizierter Tyrodelösung für 30 Min. bei 37°C aus Nabelschnurvenen von zuvor genotypisierten Spendern isoliert und auf Gelatine-beschichteten 6-Loch-Gewebekulturschalen (2 mg/ml Gelatine in 0,1 M HCl für 30 Min. bei Umgebungstemperatur) in 1,5 ml M199 Medium (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), enthaltend 20% fötales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 10 U/ml Nystatin, 5 mmol/l HEPES und 5 mmol/l TES, 1 µg/ml Heparin und 40 µg/ml endothelialer Wachstumsfaktor, kultiviert. Sie wurden durch ihre typische Pflasterstein-Morphologie, positive Immunfärbung für von Willebrandt-Faktor (vWF) und fluorimetrischen Nachweis (FACS) von PECAM-1 (CD31) sowie negative Immunfärbung für glattemuskuläres  $\alpha$ -Actin (Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) identifiziert.

Die Maus-Myelomzelllinie P3xTBA7 (stabil mit humanem CD40-Liganden transfiziert) und P3x63Ag8.653 (nicht transfizierte Kontrollzellen) wurden in RPMI 1640 Medium (Life Technologies), enthaltend 10% fötales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 10 U/ml Nystatin kultiviert.

Die Applikation von Wandschubspannung (in der Regel 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 bis 36 Stunden) bei den kultivierten Endothelzellen wurde mit Hilfe eines im Brutschrank platzierbaren Kegel-Platte-Viskosimeters wie in Schubert et al. (2000) Circ. Res. 87, 1188 beschrieben durchgeführt, mit Ausnahme der Dimension der Kulturschalen (3,5 cm im Gegensatz zu 10,0 cm Durchmesser).

### 4. RT-PCR-Analyse

Die zelluläre Gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert, daran anschließend wurde eine cDNA-Synthese mit 1-5 µg RNA und 200 U Superscript<sup>TM</sup> II Reverser Transkriptase (Life Technologies) in einem Gesamtvolumen von 20 µl entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Für den Abgleich der cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben wurden 5 µl der 1:10 verdünnten cDNA-Lösung (entsprechend einem RNA-Äquivalent von 25-125 ng) einer PCR-Reaktion (1 U Taq DNA-Polymerase (Life Technologies)) mit spezifischen Primern für die konstitutiv exprimierten Genprodukte Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und ribosomales Protein L32 (rpl32) unterworfen. GAPDH und rpl32 dienten hierbei als interne Kalibrierungs-Standards. Die PCR-Produkte wurden auf 1,5% Agarose-Gelen enthaltend 0,1% Ethidiumbromid separiert und die

Intensität der Banden wurde densitometrisch mit einem CCD-Kamerasystem und der One-Dscan Gelanalyse-Software von Scanalytics (Billerica, MA, USA) bestimmt, um in nachfolgenden PCR-Analysen das Volumen der cDNA anzupassen.

5 Alle PCR-Reaktionen wurden einzeln für jedes Primerpaar in einem lizenzierten Thermocycler (PC-Personal Cycler, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die individuellen PCR-Bedingungen waren wie folgt:

eNOS – Produktgröße 581 bp, 30 Zyklen, Anlagerungstemperatur 58°C, Vorwärtsprimer 5'-GGAACCTGTGTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 39), umgekehrter Primer 5'-CCACGTCATACT-CATCCA-3' (SEQ ID NO: 40)

IL-12p40 – 281 bp, 30 Zyklen, 62°C, 5'-GTACTCCACATTCTCTACTTCT-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-TTTGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3' (SEQ ID NO: 42)

IL-10 Rezeptor – 565 bp, 32 Zyklen, 59°C, 5'-GGACACCCATCCCAAATCAGTC-3' (SEQ ID NO: 43), 5'-CACGGTGAAATACTGCCTGGTG-3' (SEQ ID NO: 44)

15 GAPDH – 571 bp, 19 Zyklen, 58°C, 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 45), 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3' (SEQ ID NO: 46)

rp132 – 368 bp, 20 Zyklen, 60°C, 5'-GTTTCATCCGGCACCAGTCAG-3' (SEQ ID NO: 47), 5'-ACGTGCACATGAGCTGCCTAC-3' (SEQ ID NO: 48)

20 Alle Amplifikate wurden durch DNA-Sequenzierung (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) mit nachfolgendem Abgleich mit den entsprechenden Gensequenzen (Referenz: GenBank, NCBI, Bethesda, USA) eindeutig identifiziert.

### 5. Decoy-Oligonukleotid-Technik

25 Doppelsträngige Decoy-Oligonukleotide wurden von den komplementären einzelsträngigen Phosphorothioat-verbundenen Oligonukleotiden (Eurogentec, Köln, Deutschland) wie bei Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben hergestellt. Die kultivierten humanen Endothelzellen wurden für 4 Stunden mit dem jeweiligen Decoy-Oligonukleotid in einer Konzentration von 10 µmol/l vorbehandelt und nach dem Mediumwechsel dem Inkubationsmedium in  
30 derselben Konzentration zugesetzt. Die einzelsträngigen Sequenzen der Oligonukleotide waren wie folgt (unterstrichene Buchstaben kennzeichnen Phosphorothioat-verbundene Basen):

STAT-3

5'-CCTGCATTCTGGGAACTGTAG-3' (SEQ ID NO: 49),



STAT-3 mutated 5'-CCTGTATGCCGTGAGCTATAG-3', (SEQ ID NO: 50)

sowie die in Tabelle 1 abgebildeten Decoy-Oligonukleotide zur Neutralisierung des an die Position -786 des *eNOS*-Gens bindenden Transkriptionsfaktors. Die Sequenz des STAT-3 Decoy-  
5 Oligonukleotids entspricht der Position -858 bis -838 im humanen *eNOS*-Gen.

Tabelle 1

Restaurierung der inhibitorischen Wirkung von IL-10 auf die CD154-induzierte IL-12 p40 mRNA-Expression (ausgedrückt in % der IL-12 p40 mRNA-Expression in CD154-stimulierten Kontrollzellen; Mittelwert  $\pm$  S.E. von  $n$  individuellen Experimenten) in humanen kultivierten Endothelzellen von Spendern mit  $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp durch verschiedene Cis-Element Decoys (angegeben ist jeweils nur ein Strang der doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide sowie die entsprechende Position im Promoter des humanen *eNOS*-Gens). Bezugsgröße ist CD154-induzierte IL-12 p40 mRNA-Expression nach IL-10-Zusatz in Endothelzellen mit  $^{-786}\text{T/T}$ -Genotyp ( $55 \pm 2\%$  der Kontrolle,  $n=6$ ; vollständige Restaurierung) bzw.  $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp ( $136 \pm 16\%$  der Kontrolle,  $n=21$ ; kein Effekt).

SEQ ID NO	Position	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	IL-12 p40 (%)	n
15 1	-800/-779	AGCTCTTCCCTGGCCGGCTGAC	32 $\pm$ 8	7
3	-800/-779/T	AGCTCTTCCCTGGCTGGCTGAC	60 $\pm$ 10	7
5 5	-796/-774	CTTCCCTGGCCGGCTGACCCTGC	48 $\pm$ 7	5
7	-796/-774/T	CTTCCCTGGCTGGCTGACCCTGC	67	2
9	-799/-781	GCTCTTCCCTGGCCGGCTG	65	2
20 11	-802/-784	CAAGCTCTTCCCTGGCCGG	83	2
13	-797/-779	TCTTCCCTGGCCGGCTGAC	41 $\pm$ 7	5
15	-791/-773	CTGGCCGGCTGACCCTGCC	65	2
17	-794/-779	TCCCTGGCCGGCTGAC	30	2
19	-791/-782	CTGGCCGGCT	13 $\pm$ 9	3
25 21	-791/-782/T	CTGGCTGGCT	47 $\pm$ 20	3
51	-788/-770	GCCGGCTGACCCTGCCTCA	105	1
52	künstlich/T	TCTTCCCTAGCTGACTGAC	136 $\pm$ 25	5
53	künstlich	TCCCTGACCGACTCAG	80 $\pm$ 21	3
54	künstlich/T	TCCCTAGCTGACTGAC	90	1

## 6. Elektrophoretische Mobilitätsshift-Analyse (EMSA)

Die nukleären Extrakte und [<sup>32</sup>P]-markierten doppelsträngigen Konsensus-Oligonukleotide (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland), nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Autoradiographie und Supershift-Analyse wurden wie bei Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die folgenden DNA-Oligonukleotide (einzelsträngige Sequenz, Kernbindungssequenz ist unterstrichen) verwendet:

STAT-3 5'-CCTGCATTCTGGGAACTGTAG-3' (SEQ ID NO: 49)

SIE 5'-GTGCATTTCCCCGTAAATCTTGTCTACA-3' (SEQ ID NO: 51)

An das Oligonukleotid SIE binden sowohl STAT-1 wie STAT-3. Insofern wurden zusätzlich Supershift-Analysen mit einem monoklonalen Maus-Anti-Human Supershift-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologie) durchgeführt (Zugabe in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Kernextrakt für 1 Stunde bei Raumtemperatur).

## 7. Western Blot-Analyse

Die humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen wurden durch fünfmaliges aufeinanderfolgendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C/aufgeschlossen. Protein-Extrakte wurden wie bei Hecker et al. (1994) Biochem J. 299, 247 beschrieben hergestellt. 20-30 µg Protein wurden mit Hilfe einer 10%igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in der Gegenwart von SDS nach Standardprotokoll aufgetrennt und auf eine BioTrace™ Polyvinylidene Fluoride Transfermembran (Pall Corporation, Roßdorf, Deutschland) transferiert. Zum immunologischen Nachweis der eNOS und des IL-10 Rezeptors wurden monoklonale Maus-Anti-Human-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland; 1:5000 bzw. 1:3000 Verdünnung) verwendet. Die Proteinbanden wurden nach Hinzufügen eines Peroxidase-gekoppelten-Anti-Maus-IgG (1:3000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode (SuperSignal Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) und nachfolgender Autoradiographie (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) nachgewiesen. Der Auftrag und Transfer gleicher Proteinmengen wurde nach „Strippen“ der Transfermembran (5 Minuten 0,2 N NaOH, nachfolgend 3 x 10 Minuten Waschen mit H<sub>2</sub>O) durch Nachweis gleicher Proteinbanden von β-Aktin mit einem monoklonalen primären Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus IgG (beide von Sigma-Aldrich,

1:3000 Verdünnung) gezeigt.

### 8. IL-12 p40 ELISA

5. Der Enzym-gekoppelte Antikörper-Bindungs-Assay (ELISA) ist eine Standardmethode zur quantitativen Analyse von Proteinen. Er wurde wie in Lienenlücke et al. (2000) Eur. J. Immunol. 30, 2864 beschrieben zum Nachweis der IL-12 p40-Untereinheit im Überstand der inkubierten humanen Endothelzellen eingesetzt.

### 9. Statistische Analyse

10. Wenn nicht anders angezeigt, sind alle Daten in den Figuren als Mittelwert  $\pm$  SEM von n Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung wurde mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett Post-Test durchgeführt. Ein P-Wert  $<0.05$  wurde als statistisch signifikanter Unterschied angesehen.

## SEQUENCE LISTING

5 <110> Avontec GmbH

10

<120> Funktionelle Korrektur der -786C/T-Varianz des humanen eNOS-Gens

<130> HEC-008

<140> unknown

<141> 2002-09-12

20

<160> 51

25

<170> PatentIn version 3.1

30

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic sequence

35

<400> 1.

agctcttccc tggcggctg ac

22

40

5 <210> 2  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

10 <400> 2  
gtcagccggc cagggaagag ct

22

15 <210> 3  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

20 <400> 3  
agctcttccc tggctggctg ac

22

25 <210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

30 <400> 4  
gtcagccagc cagggaagag ct

22

35 <210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

40 <400> 5  
cttccttggc cggctgaccc tgc

23

45 <210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

<400> 6

gcagggtcag ccggccaggg aag

23

5 <210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> synthetic sequence

10 <400> 7

cttccttggc tggctgacc tgc

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 8

gcagggtcag ccagccaggg aag

23

20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> synthetic sequence

25

<400> 9

gctcttccct ggccggctg

19

<210> 10

30 <211> 19

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 10

35 cagccggcca gggaagagc

19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

40 <213> synthetic sequence

<400> 11  
caagctcttc cctggccgg

19

5 <210> 12  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

10 <400> 12  
ccggccaggg aagagcttg

19

15 <210> 13  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

<400> 13  
tcttccttg ccggtgac

19

20 <210> 14  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

25 <400> 14  
gtcagccggc caggaaga

19

30 <210> 15  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

35 <400> 15  
ctggccggct gaccctgcc

19

40 <210> 16  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence



19.

16

16

10

10

```

      <210>  21
      <211>  10
      <212>  DNA
40  <213>  synthetic sequence

```

<400> 21  
ctggctggct 10

5 <210> 22  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

10 <400> 22  
agccagccag 10

<210> 23  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

<220>  
<221> misc\_feature

20 <222> (9)..(9)  
<223> Y=c or t

<400> 23  
tccctggcyg gctgac 16

25 <210> 24  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> R=a or g

35 <400> 24  
gtcagtcrgc cagggg 16

40

<210> 25  
<211> 13  
<212> DNA  
5 <213> synthetic sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
10 <223> Y=c or t

<400> 25  
ctggcyyggt gac

13

15 <210> 26  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> R=a or g

25 <400> 26  
gtcagccrgc cag

13

30 <210> 27  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
35 <222> (6)..(7)  
<223> B=g or t or c

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
5 <223> B=g or t or c

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
10 <223> Y=c or t

<400> 27  
tccctbbcyg bctgac

16

15 <210> 28  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> V=g or c or a

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(11)  
<223> V=g or c or a

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> R=a or g

35 <400> 28  
gtcagvcrgv vagggga

16

40.

<210> 29  
<211> 13  
<212> DNA  
5 <213> synthetic sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(6)  
10 <223> B=g or t or c

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(10)  
15 <223> B=g or t or c

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
20 <223> Y= c or t

<400> 29  
ccctbbcygb ctg

13

25 <210> 30  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> V=g or c or a

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(9)  
<223> V=g or c or a

40

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
5 <223> R=a or g  
  
<400> 30  
cagvcrgvva ggg  
  
10 <210> 31  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence  
  
15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(4)  
<223> B=g or t or c  
  
20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> B=g or t or c  
  
25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> Y=c or t  
  
30 <400> 31  
ctbbcygbct gac  
  
<210> 32  
<211> 13  
35 <212> DNA  
<213> synthetic sequence

13

13

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
5 <223> V=g or c or a

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(11)  
10 <223> V=g or c or a

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
15 <223> R=a or g

<400> 32  
gtcagvcrgv vag

13

20 <210> 33  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(4)  
<223> B=g or t or c

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> B=g or t or c

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> Y=c or t

<400> 33  
ctbbcygbct

10

5 <210> 34  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> V=g or c or a

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(8)  
<223> V=g or c or a

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> R=a or g

25 <400> 34  
agvcrgvvag

10

<210> 35  
<211> 21  
30 <212> DNA  
<213> synthetic sequence

<400> 35  
gagtctggcc aacacaaatc c

21

35 <210> 36  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

40



<400> 36  
gacctctagg gtcatgcagg t

21

5 <210> 37  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

10 <400> 37  
gggtcagccg gcçagggaa

19

15 <210> 38  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

20 <400> 38  
agcttgatgc cctgggtggga g

21

<210> 39  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

25 <400> 39  
ggaacctgtg tgaccctc

18

30 <210> 40  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

35 <400> 40  
ccacgtcata ctcaccca

18

40 <210> 41  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> synthetic sequence

<400> 41

gtactccaca ttcctacttc t

21

5 <210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic sequence

10 <400> 42

tttgggtcta ttcggttg tg

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 43

ggacacccat cccaaatcag tc

22

20

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic sequence

25

<400> 44

cacggtgaaa tactgcctgg tg

22

<210> 45

30

<211> 19

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 45

35

tcaccatctt ccaggagcg

19

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

40

<213> synthetic sequence

<400> 46

ctgcttcacc accttcttga

20

5

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic sequence

10

<400> 47

gttcatccgg caccagtcag

20

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 48

acgtgcacat gagctgccta c

21

20

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> synthetic sequence

25

<400> 49

cctgcattct gggaactgta g

21

<210> 50

30

<211> 21

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 50

35

cctgtatgcc gtgagcta g

21

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

40

<213> synthetic sequence

<400> 51

gccggctgac cctgcctca

19

5 <210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> synthetic sequence

10 <400> 52

tcttccttag ctgactgac

19

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 53

tccctgaccg actcag

16

20

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> synthetic sequence

25

<400> 54

tccctagctg actgac

16

<210> 55

30 <211> 27

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 55

35 gtgcatttcc cgtaaattctt gtctaca

27

### Patentansprüche

1. Doppelsträngige DNA-Oligonukleotide mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 34.
2. Doppelsträngige DNA-Oligonukleotide nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels.
3. Doppelsträngige DNA-Oligonukleotide nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen, insbesondere koronare Herzkrankheit, Angina pectoris, Herzinfarkt, auch infolge eines Koronarspasmus, Herzinsuffizienz, Schlaganfall und periphere Verschlusskrankheit, von chronischen Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritis) und Schuppenflechte einschließlich Psoriasis-Arthritis, von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere Morbus Crohn, von Diabetes Typ I und II und deren Folgeerkrankungen, insbesondere diabetische Nephropathie, von multipler Sklerose, von Sarkoidosen, Kollagenosen und Vaskulitiden einschließlich Glomerulonephritiden, von akuter und chronischer Abstoßung (Vaskulopathie) transplanterter Organe, von der *graft versus host disease* (GVHD) sowie dem Ischämie/Reperfusionsschaden von Organen im Anschluss an einen chirurgischen Eingriff, von allergischem Kontaktekzem, von (Prä-)Eklampsie und schwangerschaftsinduzierter Hypertonie, von arterieller Hypertonie und ihren Folgeerkrankungen, insbesondere Linksherzhypertrophie und Gefäßwandumbau, von pulmonaler Hypertonie, von chronischer Niereninsuffizienz, von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), von bakteriellen Infektionen und ihren Folgeerkrankungen, insbesondere *Helicobacter pylori*-Gastritis, tuberkulöse Perikarditis, Lyme-Borreliose mit nachfolgender Borrelien-Arthritis und Neuroborreliose, und von Infektionen mit Hepatitis C- und HI (*human immunodeficiency*)-Viren und deren Folgeerkrankungen, insbesondere portale Hypertonie und Fibrose und opportunistische Infektionen, insbesondere *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie).

4. Verfahren zur Diagnose einer  $-786\text{C/T}$ -Varianz im *eNOS*-Gen, umfassend die folgenden Schritte:

a) Zugabe von DNA-Oligonukleotiden, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der  $-786$ -Position liegt und dem Sense-Strang des *eNOS*-Gens entspricht und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der  $-786$ -Position liegt und dem Antisense-Strang des *eNOS*-Gens entspricht,

b) Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR),

c) Durchführen einer DNA-Spaltung mit einem Restriktionsenzym, das eine Erkennungssequenz aufweist, die mindestens 4 Nukleotide lang ist und die Sequenz 5'-CCGG-3' aber nicht die Sequenz 5'-CTGG-3' enthält, und

d) Nachweisen der durch die DNA-Spaltung erhaltenen DNA-Fragmente.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei nach Schritt a) der Schritt

a) Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten DNA-Oligonukleotiden, wobei ein erstes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die die  $-786$ -Position des *eNOS*-Gens umfasst und dem Antisense-Strang entspricht und zur  $-786\text{C}$ -Variante des *eNOS*-Genpromotors komplementär ist, und ein zweites DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die dem Antisense-Strang entspricht, wobei das 5'-Ende des zweiten DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromabwärts vom 3'-Ende des ersten DNA-Oligonukleotids liegt,

eingefügt wird und an Stelle von Schritt c) und d) der Schritt

e) Nachweis der  $-786\text{C}$ - oder  $-786\text{T}$ -Variante mittels einer Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-gestützten DNA-Schmelzkurven-Analyse durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die DNA-Oligonukleotide in Schritt a) Sequenzen gemäß SEQ ID NO:35 und 36 aufweisen.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei die Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten DNA-Oligonukleotide in Schritt a) Sequenzen gemäß SEQ ID NO:37 und 38 aufweisen.

8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 6, wobei das Restriktionsenzym *HpaII* ist.

5 9. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 4 bis 8, umfassend DNA-Oligonukleotide, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der -786-Position dem Sense-Strang des eNOS-Gens entspricht und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der -786-Position dem Antisense-Strang des eNOS-Gens entspricht, gegebenenfalls Fluoreszenzfarbstoff-modifizierte DNA-Oligonukleotide, wobei ein erstes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die die -  
10 786-Position des eNOS-Gens umfasst und dem Antisense-Strang entspricht und zur -786 C-Variante des eNOS-Genpromotors komplementär ist, und ein zweites DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die dem Antisense-Strang entspricht, wobei das 5'-Ende des zweiten DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromabwärts vom 3'-Ende des ersten DNA-Oligonukleotids liegt, Reagenzien zur Durchführung einer PCR und entweder  
15 ein Restriktionsenzym, das eine Erkennungssequenz aufweist, die mindestens 4 Nukleotide lang ist und die Sequenz 5'-CCGG-3' aber nicht die Sequenz 5'-CTGG-3' enthält und Reagenzien zur Durchführung einer DNA-Spaltung, oder Reagenzien zur Durchführung einer Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-gestützten DNA-Schmelzkurven-Analyse.

20

10. DNA-Oligonukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:35 bis 38.

1/6

-871 CTGGTGTACCCACCTGCATTCTGGGAACTGTAGTTTCCCTAGTCCCCCA  
STAT T  
-821 TGCTCCCACCAGGGCATCAAGCTCTTCCCTGGCCGGCTGACCCTGCCTCA  
-786 c-Jun

Fig. 1



Fig. 2a

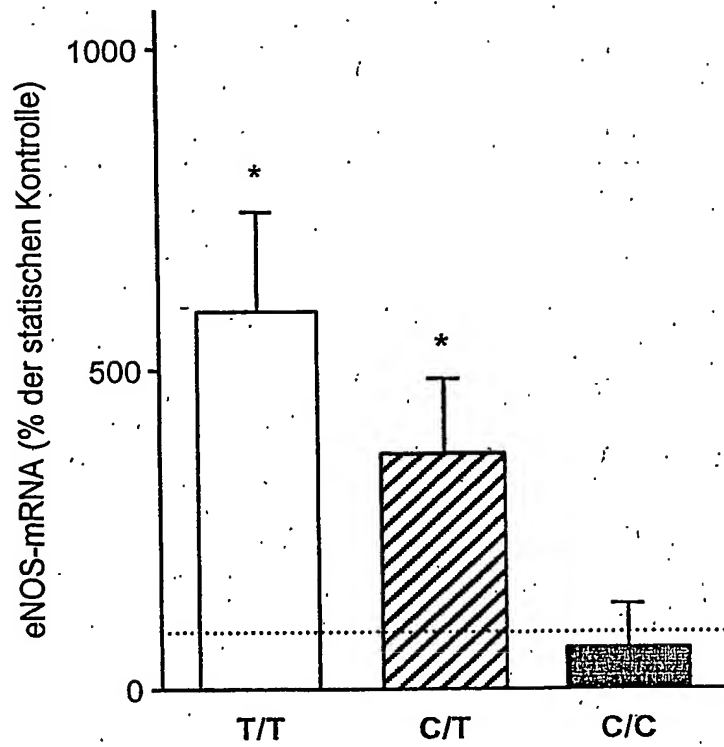
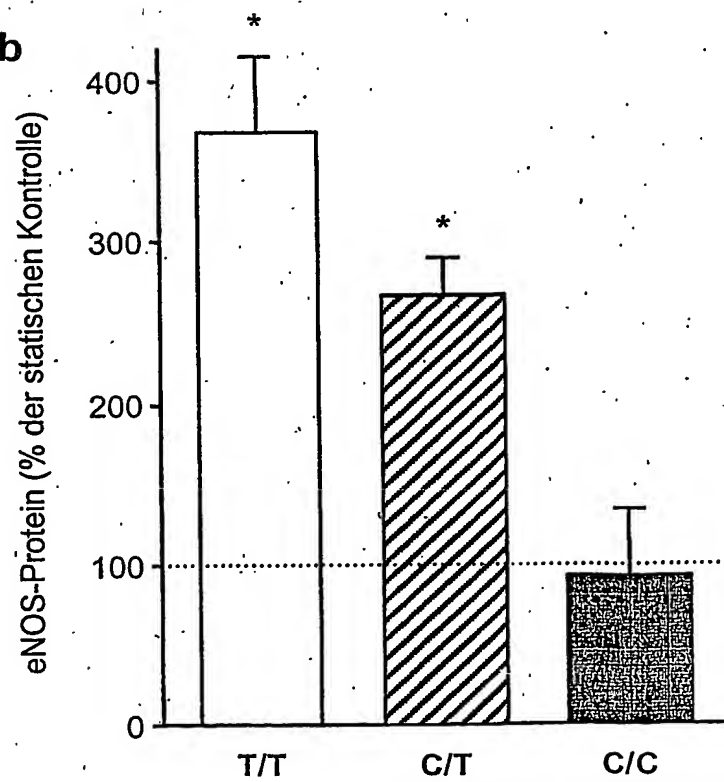


Fig. 2b



3/6

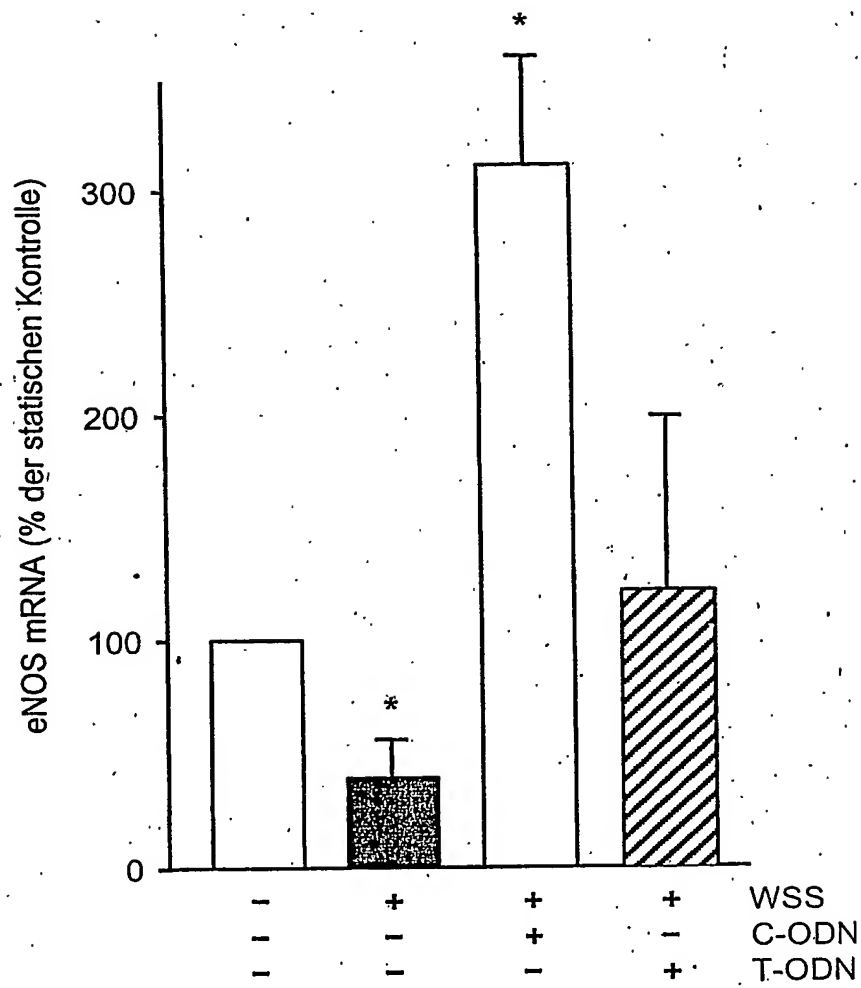


Fig. 3

Fig. 4a

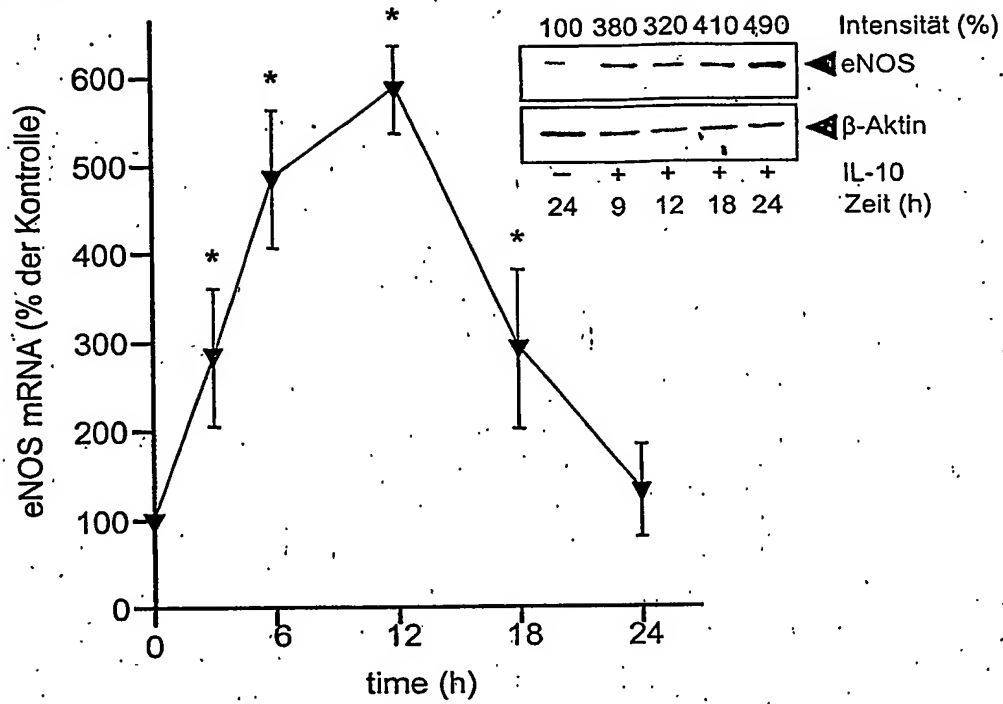


Fig. 4b

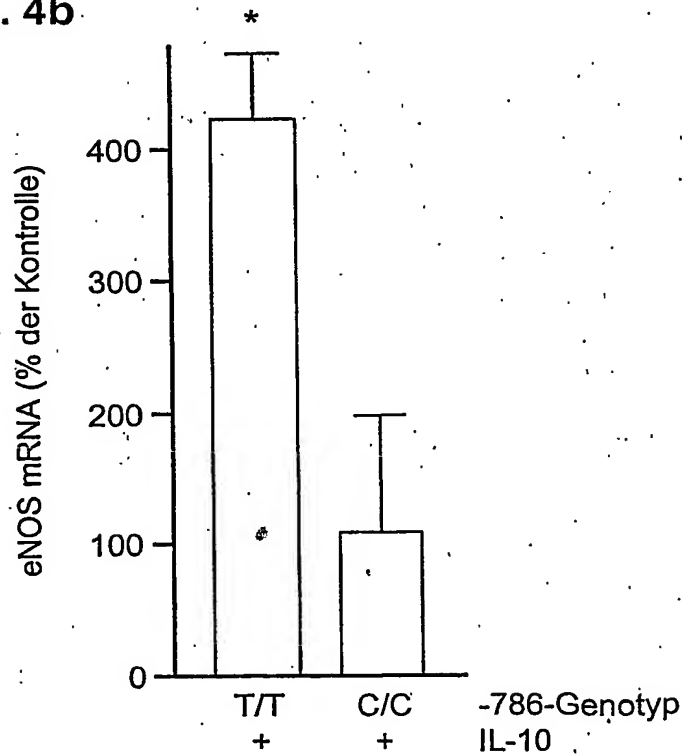


Fig. 5a

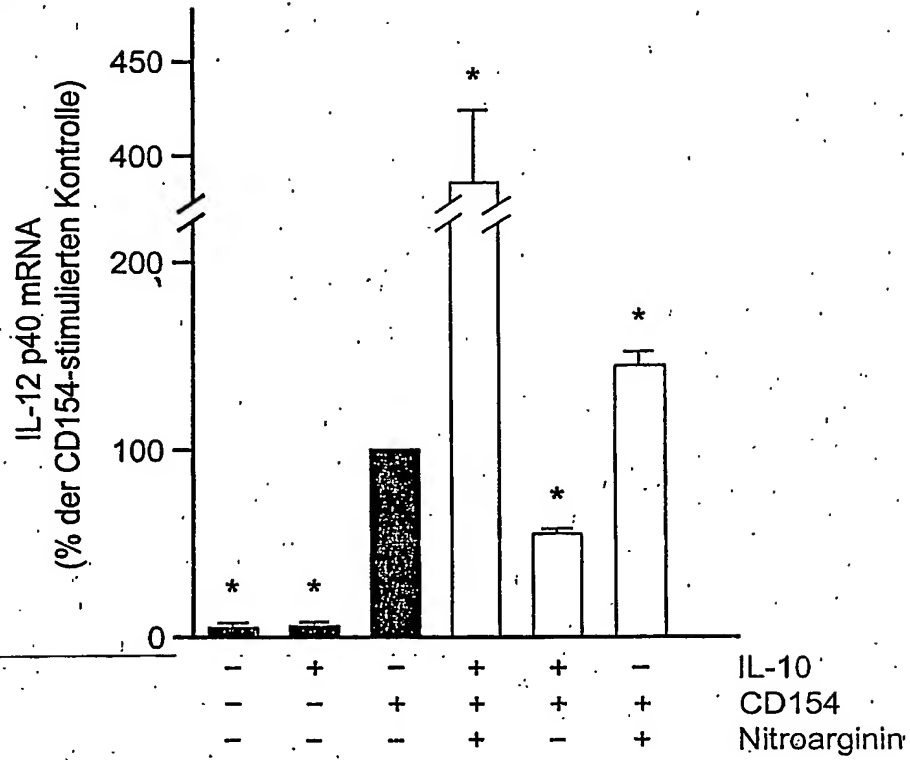
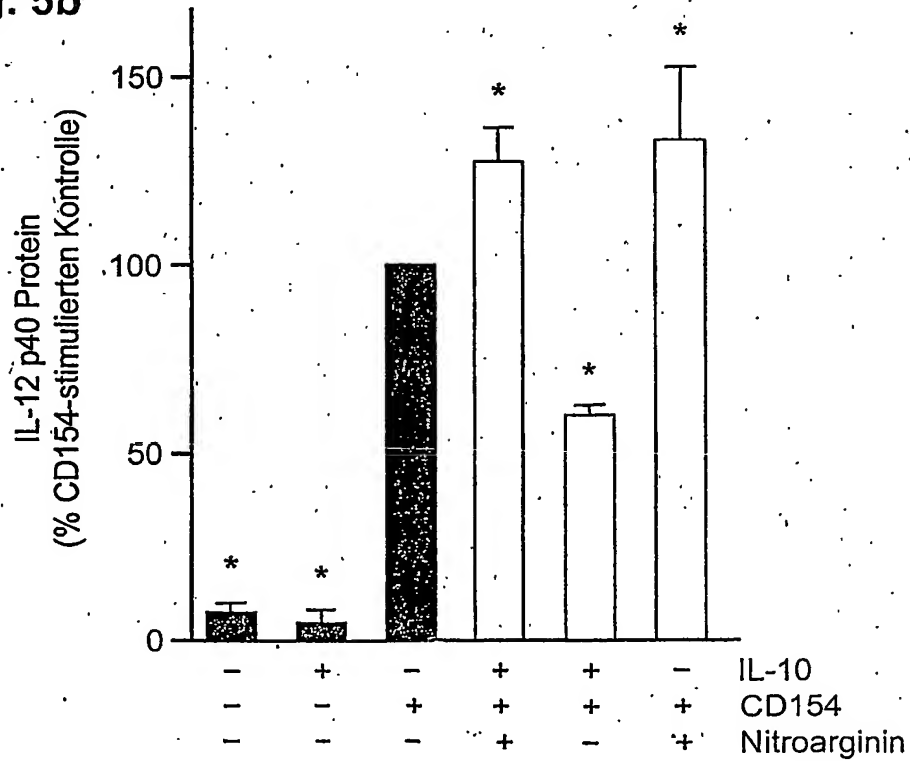


Fig. 5b



6/6

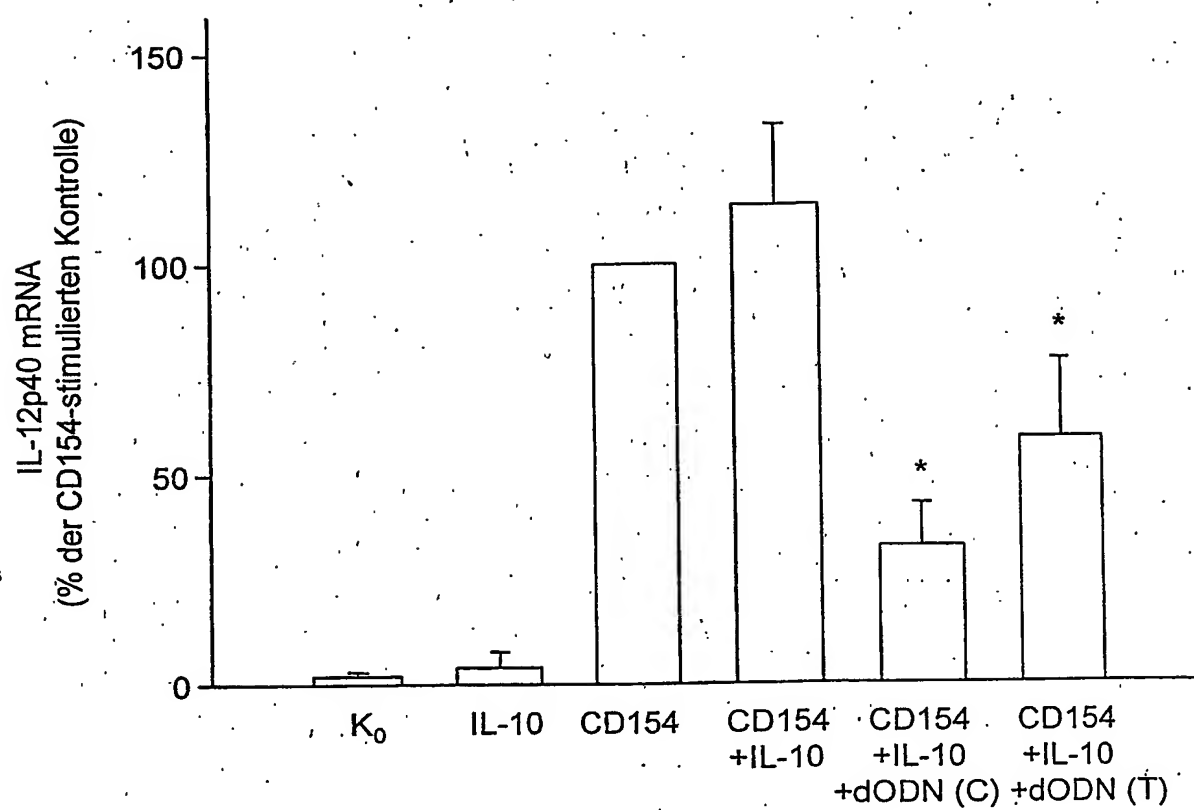


Fig. 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: a lots dots

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**